Aus dem Institut für Toxikologie der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. H. Remmer

*

ÖSTROGEN-STOFFWECHSEL UNTER EXPERIMENTELLER LEBERSCHÄDIGUNG

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
dem Fachbereich Theoretische Medizin
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

Victor H. López del Pino
aus Rancagua (Chile)

1977

Aus dem Institut für Toxikologie der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. H. Remmer

*

ÖSTROGEN-STOFFWECHSEL UNTER EXPERIMENTELLER LEBERSCHÄDIGUNG

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
dem Fachbereich Theoretische Medizin
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

Victor H. López del Pino
aus Rancagua (Chile)

1977

Dekan: Prof. Dr. R. Jacob
1. Berichterstatter: Priv.-Dozent Dr. Dr. H.M. Bolt
2. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Remmer
Korreferent: Prof. Dr. A. E. Schindler

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Die Experimente zur vorliegenden Dissertation wurden von Oktober 1974 bis März 1976 am Institut für Toxikologie der Universität Tübingen unter der Leitung von Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Dr. rer. nat. Hermann M. Bolt vorgenommen.

Herrn Prof. Dr. H. Remmer danke ich für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes.

Dem Deutschen Akademischen Austauschdienst sei für die Gewährung eines Forschungsstipendiums gedankt.

Über die vorliegenden Untersuchungen wurde auf dem "5th European Workshop on Drug Metabolism" im Juni 1976 in Stockholm berichtet.

Eine erste Mitteilung wurde ferner in vorläufiger Form veröffentlicht (Endokrinologie 66, 250, 1975).

INHALTSVERZEICHNIS

1.	EINLEITUNG	1
1.1	AUFGABENSTELLUNG	2
2.	MATERIAL UND METHODEN	4
2.1	MATERIAL	4
2.1.1	Radioaktive Steroide	4
2.1.2	Reinigung der radioaktiven Steroide	4
2.1.3	Nichtradioaktive Steroide	4
2.2	TIERMATERIAL UND VORBEHANDLUNG DER TIERE ...	4
2.2.1	Äthanol-Vorbehandlung	5
2.2.2	Tetrachlorkohlenstoff-Vorbehandlung	5
2.2.3	Thioacetamid-Vorbehandlung	5
2.3	PRÄPARATION DER LEBERMIKROSOMEN	5
2.4	MIKROSOMALE INKUBATIONEN	6
2.4.1	Messung der mikrosomalen Cytochrome	7
2.4.2	Messung von Parametern des Arzneistoffwechsels	7
2.4.3	Messung der Östrogen-2-Hydroxylase anhand der Freisetzung von Tritium	7
2.4.4	Inkubation von 6,7-^{3}H-Östradiol und Isolierung der Metabolite	8
2.4.5	Aromatisierung von 1ß,2ß-^{3}H-Testosteron	9
2.5	MESSUNG DER FREISETZUNG VON TRITIUM AUS 2,4,6,7-^{3}H-ÖSTRADIOL IN VIVO.....	9
2.6	PROTEINBESTIMMUNG	10

3. ERGEBNISSE 12

3.1 DIE WIRKUNG EINER CHRONISCHEN VORBEHANDLUNG VON RATTEN MIT THIOACETAMID AUF ENZYME DES MIKROSOMALEN ARZNEI- UND ÖSTROGENSTOFFWECHSELS 12

3.2 DER ZEITLICHE VERLAUF DER DURCH THIOACETAMID INDUZIERTEN VERÄNDERUNGEN DES ÖSTROGENABBAUS IN DER RATTENLEBER..... 15

3.3 DIE WIRKUNG EINER LEBERSCHÄDIGUNG DURCH THIOACETAMID AUF DIE MIKROSOMALE AROMATISIERUNG VON TESTOSTERON BEI DER RATTE 21

3.4. DIE WIRKUNG WEITERER HEPATOTOXISCHER STOFFE (ÄTHANOL, CCl_4) AUF DEN ÖSTROGENSTOFFWECHSEL IM VERGLEICH ZUR THIOACETAMID-VERGIFTUNG 22

4. DISKUSSION 31

5. SCHLUSSFOLGERUNG 37

6. ZUSAMMENFASSUNG 38

7. LITERATURVERZEICHNIS 39

1. EINLEITUNG

Die Veränderung des Stoffwechsels östrogener Hormone bei Leberschädigung hat in den letzten Jahren ein starkes Interesse gefunden (siehe Adlercreutz und Tenhunen, 1970). So berichteten Zumoff und Mitarb. (1968) bei Patienten mit Leberzirrhose über eine verringerte Ausscheidung 2-hydroxylierter Östrogene im Urin, während die Ausscheidung an 16α-Hydroxyöstron vermehrt gefunden wurde. Ferner war bei diesen Patienten die Reduktion von 16α-Hydroxyöstron in Östriol beeinträchtigt.

Demgegenüber untersuchten Wenzel, Blum und Kraas (1968) die Oxidation von 17α-^{3}H-markiertem Östradiol zu Östron und fanden, daß chronisch Leberkranke eine Steigerung des Umsatzes von Östradiol in Östron zeigten. Ein gleichsinniges Verhalten stellten diese Autoren bei Ratten nach chronischer Leberschädigung durch Thioacetamid fest.

Der scheinbare Widerspruch einer vermehrten Umsetzung von Östradiol in Östron konnte bislang nicht schlüssig erklärt werden. Untersuchungen in vivo an Mensch oder Versuchstier lassen zu viele Deutungsmöglichkeiten offen, als daß sie hier zu eindeutigen Schlußfolgerungen führen könnten. Da sich die an den erwähnten Umsetzungen beteiligten Enzyme im endoplasmatischen Retikulum der Leberzelle finden, lag es nahe, das von Wenzel et al. (1968) vorgeschlagene Modell der Thioacetamid-vergifteten Ratte zu Untersuchungen über den Östrogenstoffwechsel in vitro heranzuziehen.

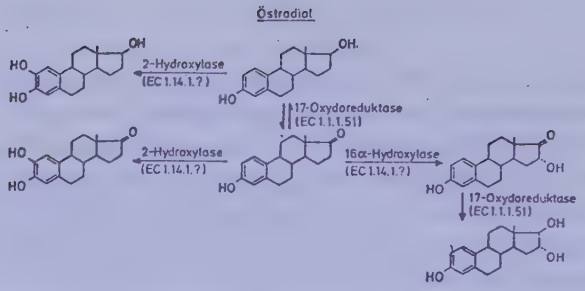


Abbildung 1: Schema der Metabolisierung von Östradiol in vivo.

Die hauptsächlichen oxidativen Stoffwechselwege der natürlichen Östrogene sind in Abb. 1 dargestellt. Östradiol steht mit Östron über die 17ß-Hydroxysteroiddehydrogenase ("17-Oxidoreduktase" in Abb. 1) im Gleichgewicht. Östron und Östradiol können an C-2 zu 2-Hydroxyöstrogenen hydroxyliert werden, die dann einem weiteren Abbau durch Methylierung bzw. Glutathionkonjugation unterliegen (Fishman et al. 1965, 1966, 1969, 1970; Knuppen und Breuer, 1966; Kuss, 1971). Andererseits wird Östron durch die 16α-Hydroxylase zu 16α-Hydroxyöstron hydroxyliert, das dann über eine weitere Oxidoreduktase in Östriol umgewandelt werden kann.

In der vorliegenden Arbeit soll bei der Ratte der Einfluß einer experimentellen Leberschädigung auf den mikrosomalen Stoffwechsel von Östrogenen in der Leber untersucht werden.

1.1. AUFGABENSTELLUNG

Im Mittelpunkt der Betrachtungen steht die durch Wenzel et al. (1968) aufgeworfene Frage, ob die beim Menschen bekannten Veränderungen des oxidativen Östrogenstoffwechsels bei der Ratte durch Vergiftung mit Thioacetamid erzeugt werden können. Hierzu wurden nach ent-

sprechender Vorbehandlung der Tiere Rattenlebermikrosomen gewonnen und der mikrosomale Stoffwechsel von Östradiol (und Östron) in vitro untersucht. Als empfindlicher Parameter der 2-Hydroxylierung wurde meist die Freisetzung von Tritium aus 2,4,6,7-^{3}H-markiertem Östradiol gemessen (siehe Bolt et al., 1973). Das Ausmaß der 16α-Hydroxylierung wurde durch Bestimmung der aus Östradiol gebildeten Produkte 16α-Hydroxyöstron und Östriol erfaßt. Zum Vergleich wurden Parameter des mikrosomalen Arzneistoffwechsels bestimmt (Cytochrom P-450, Cytochrom B_5, NADPH-Cytochromcund oxydative Arzneimittelabbau-Reaktionen).

Unterschieden wurde zwischen akuter und chronischer Thioacetamid-Behandlung, wobei im Falle der chronischen Behandlung auch der Zeitverlauf der Thioacetamid-induzierten Veränderungen zu bestimmen war.

Die Wirkungen des Thioacetamid wurden ferner verglichen mit denen nach akuter und chronischer Gabe von Äthanol, sowie nach akuter Tetrachlorkohlenstoff-Behandlung.

Die Untersuchungen zeigen, daß eine Behandlung mit Thioacetamid die in vitro bestimmte mikrosomale 2-Hydroxylierung sehr stark reduziert. In einer weiteren Versuchsreihe war daher zu prüfen, ob dieser Effekt auch unter in-vivo-Bedingungen auftritt.

Schließlich war die Frage zu untersuchen, ob den Wirkungen der Thioacetamidvergiftung auf den Östrogenabbau auch Wirkungen auf die hepatische Östrogenbildung, also auf die Umwandlung von Androgenen in Östrogene gegenüberstehen. Aus diesem Grunde wurde der Effekt einer Thioacetamid-Vorbehandlung auf die mikrosomale Aromatisierung von Testosteron untersucht.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. MATERIAL

2.1.1. Radioaktive Steroide

a) 2,4,6,7-^{3}H-Östradiol; 6,7-^{3}H-Östradiol; 2,4,6,7-^{3}H-Östron und 6,7-^{3}H-Östron wurden von der Fa. NEN, Boston, Mass., bezogen.

b) Methoxy-^{3}H-Mestranol wurde durch Methylierung von nicht-radioaktivem Äthynylöstradiol hergestellt (Bolt und Bolt, 1974)

c) 1ß, 2ß-^{3}H-Testosteron wurde von der Firma NEN, Boston, Mass., bezogen.

2.1.2. Reinigung der radioaktiven Steroide

Alle genannten ^{3}H-markierten Steroide wurden vor ihrer Benutzung gereinigt. Hierzu wurde die Säulenchromatographie auf Aluminium-Oxid angewandt (siehe Bolt und Remmer, 1972).

2.1.3. Nichtradioaktive Steroide

Östradiol, Östron, 16α-Hydroxyöstron und Östriol wurden von der Fa. Merck, Darmstadt, bezogen. 2-Hydroxyöstradiol wurde freundlicherweise von der Fa. Schering, Berlin, zur Verfügung gestellt.

2.2. TIERMATERIAL UND VORBEHANDLUNG DER TIERE

Es wurden Ratten vom Stamm Wistar der Tierzuchtanstalt Ivanovas, Kisslegg, verwendet. Das Gewicht am Versuchsanfang betrug 150 - 180 g. Die Tiere erhielten das Futter Altromin ® und Wasser ad libitum.

2.2.1. Äthanol-Vorbehandlung

a) Akut: Das Futter wurde den Tieren 6 Stunden vor der Äthanol-Behandlung entzogen. Die Verabreichung erfolgte durch perorale Gabe einer 40%igen (v/v) wässrigen Äthanol-Lösung. Die Dosis betrug 6 ml/kg. Die Ratten wurden nach 8 Stunden getötet.

b) Chronisch: 20% (v/v) Äthanol wurde über einen Zeitraum von 100 Tagen dem Trinkwasser beigefügt. Die Ratten wurden dann nach 12 Stunden Nahrungsentzug getötet.

2.2.2. Tetrachlorkohlenstoff-Vorbehandlung

Tetrachlorkohlenstoff wurde per os in einer Dosierung von 2,5 ml/kg bzw. 5 ml/kg (Olivenöl/CCl_4=1/1) nüchtern verabreicht. Drei Stunden nach der Behandlung wurden die Ratten getötet.

2.2.3. Thioacetamid-Vorbehandlung

a) Akut: Die Ratten bekamen Thioacetamid p.o. als wässrige Lösung (50 mg/ml). Die Dosierungen betrugen hierbei 100 mg/kg, 200 mg/kg und 300 mg/kg. Vierundzwanzig Stunden nach der Behandlung wurden die Tiere getötet.

b) Chronisch: Die Behandlung durch Zusatz von 0,1% Thioacetamid zum Trinkwasser erfolgte über einen Zeitraum von 6 Wochen.

2.3. PRÄPARATION DER LEBERMIKROSOMEN

Lebermikrosomen wurden nach Remmer et al. (1967) präpariert. Die Leberproben wurden gewogen, mit eiskalter 0,25 molarer Saccharoselösung versetzt und homogenisiert. Das Homogenat

wurde 10 Minuten bei 7 000 g zentrifugiert, um Zelltrümmer, Kerne und Mitochondrien zu entfernen. Der Überstand wurde verworfen und in der Ultrazentrifuge bei 105 000 g für 45 Minuten zentrifugiert. Die abzentrifugierte Mikrosomenfraktion wurde in 0,25 M Saccharose suspendiert und erneut für 45 Minuten bei 105 000 g in der Ultrazentrifuge zentrifugiert. Die sedimentierte Mikrosomenfraktion wurde wieder mit Saccharose 0,25 M aufgenommen. Diese Mikrosomensuspension wurde eingefroren und für die weiteren Untersuchungen verwendet.

2.4. MIKROSOMALE INKUBATIONEN

Um möglichst wenig Mikrosomen pro Ansatz zu benötigen, wurden die Reaktionen im Mikromaßstab in Eppendorfgefäßen durchgeführt. Vor der Inkubation wurden die Substrate (Östradiol bzw. Östron) in äthanolischer Lösung in die Reaktionsgefäße gegeben und dann das Lösungsmittel eingedampft. Für die enzymatische Reaktion wurden folgende Lösungen einpipettiert:

100 µl 0,05 M $MgCl_2$
400 µl 0,25 M Tris-KCl-Puffer (pH 7.5)
100 µl 0,008 M DL-Natriumisocitrat
300 µl Mikrosomensuspension (ca. 4 mg mikrosomales Protein/ml)
5 µl Isocitratdehydrogenase (Boeringer)

Diese Mischungen wurden für 10 Minuten bei 37° C vorinkubiert. Die Inkubationen wurden mit 100µl 0,01 M NADP-Na-Lösung gestartet und in Gegenwart von Luftsauerstoff und unter Schütteln bei 37° durchgeführt.

2.4.1. Messung der mikrosomalen Cytochrome

Der Gehalt der Lebermikrosomen an Cytochrom P-450 und Cytochrom b_5 wurde nach Omura und Sato (1964) bestimmt. Die Bestimmung der Aktivität der mikrosomalen NADPH-Cytochrom c-Reduktase erfolgte nach Williams und Kamin (1962).

2.4.2. Messung von Parametern des Arzneistoffwechsels.

a) Die p-Hydroxylierung von Anilin wurde nach der Methode von Schenkman et al. (1967) gemessen.

b) Die Demethylierung von Aminopyrin wurde nach Schoene et al. (1972) bestimmt.

c) Die Mestranol-Demethylierung wurde nach Kappus et al. (1973) gemessen.

2.4.3. Messung der Östrogen-2-Hydroxylase anhand der Freisetzung von Tritium

Jede mischfunktionelle Hydroxylierung von tritiummarkierten Steroiden an einer markierten Position führt zur Bildung von Tritiumwasser (HTO):

$R\text{-}T + O_2 + NADPH + H^+ \longrightarrow R\text{-}OH + NADP^+ + HTO$

Substrate waren im vorliegenden Falle 2,4,6,7-^{3}H-Östradiol und 2,4,6,7-^{3}H-Östron. Diese tritiummarkierten Steroide wurden mit so viel nicht markiertem Östradiol bzw. Östron vermischt, daß insgesamt 100 nMol pro 1ml Inkubation eingesetzt wurden. Zur Bestimmung des tritiummarkierten Wassers (HTO) wurde ein Aliquot von 0,2 ml nach 1, 2, 3 und 4 Minuten entnommen und in 0,4 ml kalte 7,5%ige Trichloressigsäurelösung gegeben, um die Enzymreaktion zu beenden. Die gefällten Proteine wurden abzentrifugiert, 0,5 ml des Überstandes wurden mit 4,5 ml H_2O verdünnt und im Vakuum bei 40° C destilliert. Vom Destillat wurde jeweils 1 ml für die Messung der Radioaktivität des

Tritiumwassers in einem Flüssigkeitsszintillationszähler verwendet. Als Szintillationslösung kam Bray'sche Lösung zur Anwendung. (Bray 1960).

Die erhaltenen HTO-Radioaktivitätswerte wurden umgerechnet in pg Atom Wasserstoff, der während der enzymatischen Reaktion von den jeweils markierten Positionen verdrängt worden war.

Zuverlässigkeit und Anwendbarkeit dieses methodischen Vorgehens wurden bereits früher ausführlich demonstriert (Bolt et al., 1973, 1974). Da die Hydroxylierung von Östrogenen an C-6 und C-7 sehr gering ist gegenüber der Hydroxylierung an C-2, gibt die Labilisierung von Tritium aus 2,4,6,7-^{3}H-Östradiol und Östron mit guter Näherung die Aktivität der mikrosomalen 2-Hydroxylase an. Außerdem ist wesentlich, daß generell bei der ortho-Hydroxylierung von Östrogenen weder ein kinetischer Isotopeneffekt, noch ein sog. NIH-shift auftreten (Daly et al., 1972).

2.4.4. Inkubation von 6,7-^{3}H-Östradiol und Isolierung der Metabolite.

Die mikrosomale Inkubation von 6,7-^{3}H-Östradiol erfolgte wie in 2.4 bereits beschrieben (Substratkonzentration = 100 nMol/ml). Die Reaktion wurde durch Zusatz von Äther-Chloroform (3:1 v/v) nach 15 Minuten beendet. Kurz vor der Beendigung wurden 20 μl einer wässrigen Lösung, die jeweils 0,1 mg Östradiol, 16α-Hydroxyöstron, Östron und Östriol enthielt, einpipettiert. Die Inkubationsansätze wurden je viermal mit Äther/Chloroform 3:1 extrahiert. Die vereinigten Extrakte wurden dann im Luftstrom bis zur Trockenheit eingedampft und in jeweils 0,2 ml Methanol aufgenommen. Die methanolischen Extrakte wurden auf mit Kieselgel beschichteten Aluminium-Folien (mit Fluoreszenzindikator) chromatographiert. Benutzt wurden zwei von Diczfalusy und Lisboa (1962) beschriebene Fließmittel-Systeme,

a) Cyclohexan, Acetessigester und Äthanol (45:45:10) und
b) Acetessigester / Cyclohexan (50:50).

Die ätherlösliche Fraktion wurde zuerst mit System a), dann, nach Abdampfen des Fließmittels, nochmals in System b) chromatographiert. Nach Entwicklung der Chromatogramme wurde die Lage der radioaktiven Banden mit Hilfe des Dünnschicht-Scanners der Fa. Berthold (Wildbad) ermittelt. Die Rf-Werte wurden mit denen von nichtmarkierten Vergleichssubstanzen, deren Lage im UV-Licht anhand der Fluoreszenzlöschung bestimmt wurde, verglichen.

Die radioaktiven Banden wurden von der Platte entfernt, in Zählgläser gegeben und die Steroide durch Zugabe von jeweils 1 ml Methanol aus dem Kieselgel eluiert. Die Radioaktivität der Banden wurde dann in Toluol-Szintillator (0,4% PPO in Toluol) im Flüssigkeitszintillationszähler gemessen.

2.4.5. Aromatisierung von 1ß,2ß-^{3}H-Testosteron

Die Aromatisierung von 1ß,2ß-^{3}H-Testosteron bedingt eine Freisetzung von ^{3}H, das zu HTO oxydiert wird. Wie in 2.4.3. beschrieben wurde, läßt sich dieses während der Inkubation gebildete HTO durch Destillation und Radioaktivitätsmessung bestimmen.

Die Inkubation mit Lebermikrosomen und NADPH-regenerierendem System (Isocitrat und Isocitratdehydrogenase) erfolgte wie in 2.4 beschrieben. Die Substratkonzentration im Ansatz betrug 200 nMol/ml. Die Reaktion wurde über 20 Minuten verfolgt. Die Bestimmungen erfolgten nach 5, 10, 15 und 20 Minuten.

2.5. MESSUNG DER FREISETZUNG VON TRITIUM AUS 2,4,6,7-^{3}H-ÖSTRADIOL IN VIVO

Die Bestimmung der Freisetzung von Tritium aus 2,4,6,7-^{3}H-Östradiol in vivo wurde nach Wenzel et al. (1966, 1970) vorgenommen. Die Tiere erhielten am Versuchstag jeweils eine

Spurendosis von 2,4,6,7-^{3}H-Östradiol (1 μCi), in 0,2 ml Äthanol : Propylenglykol (1:1) gelöst, i. v. injiziert. Anschließend wurden jeweils 3 Ratten in einen Exsikkator gesetzt, dem getrocknete Luft zugeführt wurde. Der von den Tieren in die Ausatmungsluft abgegebene Wasserdampf wurde in einer mit Methanol/Trockeneis beschickten Kühlfalle kondensiert. Die Wasserproben wurden in Bray'scher Lösung aufgenommen und die Radioaktivität im Szintillationszähler gemessen.

Die Berechnung der Freisetzung von Tritium erfolgte nach der Formel:

$$\frac{\text{dpm als HTO im Gesamtkörperwasser}}{\text{dpm injiziertes 2,4,6,7-}^{3}\text{H-Östradiol}} \times 100 = \% \text{ des injizierten } ^{3}\text{H als HTO im Körperwasser}$$

Als Gesamtkörperwasser wurde 66% des Körpergewichtes angesetzt (Pace und Rathbun, 1945).
Die Bestimmungen erfolgten stündlich bis zur 8. Stunde. Die Einzel-Bestimmungspunkte wurden, wie in Abb. 2 dargestellt, aufgetragen.

2.6. PROTEINBESTIMMUNG

Der Proteingehalt der Mikrosomensuspensionen wurde nach Lowry et al. (1951) bestimmt. Die Werte wurden dabei mit Hilfe einer Eichkurve ermittelt, die mit Rinderserumalbumin erstellt wurde.

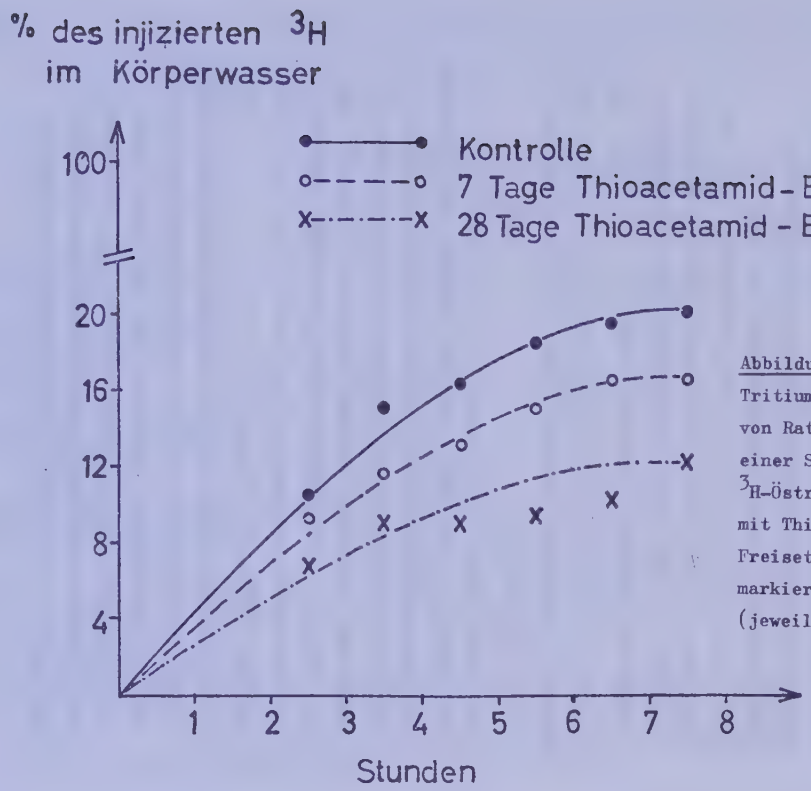


Abbildung 2.:
Tritium als HTO im Körperwasser von Ratten nach i. v. Injektion einer Spurendosis von 2,4,6,7-^{3}H-Östradiol (1 µCi). Behandlung mit Thioacetamid verringert die Freisetzung von Tritium aus den markierten Positionen des Steroids (jeweils Mittelwerte von 3 Tieren).

3. ERGEBNISSE

3.1. DIE WIRKUNG EINER CHRONISCHEN VORBEHANDLUNG VON RATTEN MIT THIOACETAMID AUF ENZYME DES MIKROSOMALEN ARZNEI- UND ÖSTROGENSTOFFWECHSELS

Ratten wurden durch Gabe von 0,1% Thioacetamid im Trinkwasser chronisch vorbehandelt (siehe 2.2.3). Lebermikrosomen dieser Ratten wurden zu den folgenden Untersuchungen verwendet. Tab. 1 und Tab. 2 zeigen die erhaltenen Ergebnisse von mikrosomalen Inkubationen. Die Daten stimmen mit denen von Wenzel et al. (1968) dahingehend überein, daß die Vorbehandlung von Ratten mit Thiocetamid auch in vitro eine vermehrte Umsetzung von Östradiol in Östron bewirkt.

Die Entstehung von 16α-Hydroxyöstron aus Östradiol ist um den Faktor 2,5 gesteigert, während die des Östriols leicht vermindert ist (Tab. 2).

Sehr auffällig ist die Verminderung des Cytochrom P-450 durch Thioacetamid, die ihrerseits mit einer Verminderung Cytochrom-P-450-abhängiger Oxidationen einhergeht (Tab. 1). Neben der starken Erniedrigung der Anilinhydroxylase fällt besonders die Abnahme der Tritiumlabilisierung aus 2,4,6,7-^{3}H-Östradiol um etwa 50% auf. Die N-Demethylierung von Aminopyrin erscheint ebenfalls erniedrigt, wenn auch die Abnahme nicht statistisch gesichert werden konnte (Tab. 1).

Des weiteren fällt auf, daß der Gehalt der Lebermikrosomen an NADPH-Cytochrom-c-Reduktase, die als Flavoprotein den Elektronentransport von NADPH auf Cytochrom P-450 katalysiert, durch Thioacetamidbehandlung unverändert bleibt (Tab. 1). Dies legt nahe, daß der geschwindigkeitsbestimmende Schritt für die Reduktion der Aktivitäten mischfunktioneller mikrosomaler

Tabelle 1.: Die Wirkung einer chronischen Vorbehandlung von Ratten mit Thioacetamid auf Enzyme des mikrosomalen Arznei- und Östrogenstoffwechsels ($\bar{x} \pm s_x$). Die Geschwindigkeiten der enzymatischen Reaktionen wurden bei 37° bestimmt.

	Kontrollen (n = 3)	Thioacetamid-behandelte Ratten (n = 6)	p (t-Test)
Cytochrom P-450 (nMol/mg mikrosomales Protein)	0,77 ± 0,09	0,29 ± 0,09	$p<0,001$
NADPH-Cytochrom c-Reduktase (nMol/mg mikrosomales Protein/min)	54,7 ± 9,9	58,5 ± 8,1	n. s.
N-Demethylierung von Aminopyrin (nMol/mg mikrosomales Protein/min)	3,01 ± 0,62	2,21 ± 0,64	n. s.
p-Hydroxylierung von Anilin (nMol/mg mikrosomales Protein/min)	0,80 ± 0,20	0,29 ± 0,10	$0,005>p>0,001$
Aromatische Hydroxylierung von Östradiol, gemessen als Labilisierung von Tritium aus 2,4,6,7-^{3}H-Östradiol (pg Atom freigesetzter Wasserstoff/mg mikrosomales Protein/min)	640 ± 169	353 ± 116	$0,02>p>0,01$

n. s. = nicht signifikant unterschieden

Die Umsetzung der Substrate erfolgte in Gegenwart von O_2 und NADPH-regenerierendem System.

Tabelle 2.: Die Wirkung einer chronischen Vorbehandlung von Ratten mit Thioacetamid auf die mikrosomale Umsetzung von 6,7-^{3}H-Östradiol. Substratkonzentration = 50 µM.

	Kontrollen	Thioacetamid-behandelte Ratten	p (t-Test)
Umsetzung von 6,7-^{3}H-Östradiol pro mg mikrosomales Protein in 15 min. Isolierte Produkte:			
Östron (nMol/mg mikrosomales Protein)	1,79 ± 0,66	3,39 ± 0,91	0,05>p>0,025
16α-Hydroxyöstron (nMol/mg mikrosomales Protein)	4,55 ± 0,50	12,0 ± 2,1	p<0,001
Östriol (nMol/mg mikrosomales Protein)	1,54 ± 0,19	1,14 ± 0,16	0,02>p>0,01

Die Umsetzung von 6,7-^{3}H-Östradiol erfolgte in Gegenwart von O_2 und NADPH-regenerierendem System.

Hydroxylasen unter Thioacetamid die starke Abnahme des Cytochrom P-450 ist.

3.2. DER ZEITLICHE VERLAUF DER DURCH THIOACETAMID INDUZIERTEN VERÄNDERUNGEN DES ÖSTROGENABBAUS IN DER RATTENLEBER

Nach i. v. Applikation einer Spurendosis von 2,4,6,7-^{3}H-Östradiol an Ratten erscheinen über 20% der injizierten Radioaktivität im Körperwasser der Tiere als HTO (vergl. Wenzel et al., 1971; Bolt et al., 1973). Werden Ratten mit Thioacetamid behandelt, so vermindert sich diese Freisetzung des Tritium aus den Positionen 2,4,6,7 des Östradiol (Abb. 2).

Es wurde früher beschrieben (Bolt et al., 1973), daß die Hydroxylierung von Östradiol an C-6 und C-7 sehr gering ist, und daß deshalb die Freisetzung von Tritium aus 2,4,6,7-^{3}H-Östradiol in erster Linie das Ausmaß der aromatischen Östrogenhydroxylierung wiedergibt.

Die Abbildungen 3 bis 5 zeigen den Zeitverlauf der Beeinflussung hepatischer mikrosomaler Enzyme des Östrogenabbaus während und nach Thioacetamid-Behandlung, in Beziehung zur Freisetzung von ^{3}H aus 2,4,6,7-^{3}H-Östradiol in vivo (Abb. 6). Die Werte sind jeweils in Prozent der Kontrollwerte angegeben, die bei unbehandelten Tieren gefunden wurden. Die Kontrollwerte sind in den Legenden angegeben. Bereits während der ersten Woche der Thioacetamid-Behandlung erfolgt ein drastischer Abfall des Gehalts der Lebermikrosomen an den Cytochromen P-450 und b_5 (Abb. 3). Nach Absetzen des Thioacetamid normalisiert sich zumindest Cytochrom P-450 sehr rasch. In Tab. 1 wurde gezeigt, daß es unter chronischer Behandlung mit Thioacetamid zu einer Verringerung der mikrosomalen 2-Hydroxylierung von Östradiol kommt. Demgegenüber steigt die Bildung von Östron aus Östradiol über die 17ß-Hydroxysteroiddehydrogenase unter Thioacetamid-Behandlung an.

Abbildung 3: Mikrosomales Cytochrom P-450 und Cytochrom b_5 der Leber unter und nach einer 6-wöchigen Behandlung von Ratten mit Thioacetamid.

Kontrollwerte (unbehandelte Tiere)
(Mittelwert - Standard - Abweichung)

	n	$\bar{x}$	s_x
Cytochrom P-450 nMol/mg mikrosomales Protein	6	0,65	0,090
Cytochrom b_5 nMol/mg mikrosomales Protein	6	0,49	0,050

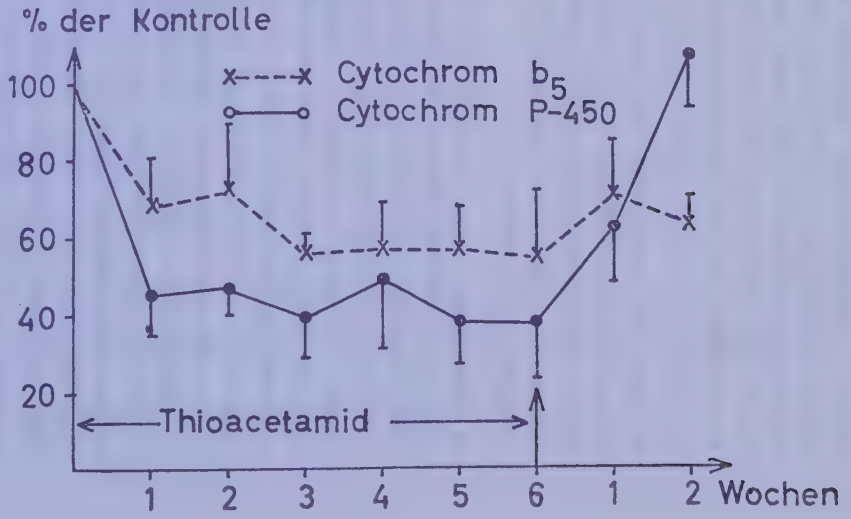


Abbildung 4: Entstehung von 2-Hydroxyöstradiol aus Östradiol und Freisetzung von ^{3}H aus 2,4,6,7-^{3}H-Östradiol durch Lebermikrosomen in vitro unter und nach einer 6-wöchigen Behandlung von Ratten mit Thioacetamid.

Kontrollwerte:	n	$\bar{x}$	s_x	
Entstehung von 2-Hydroxyöstradiol (Substratkonzentration = 50 nMol/ml)	5	3,65	0,22	(nMol/mg mikros. Protein/15 min)
^{3}H-Freisetzung aus 2,4,6,7-^{3}H-Östradiol (Substratkonz. = 100nMol/ml	6	2540	1210	(pg Atom H/mg mikros. Protein/min)

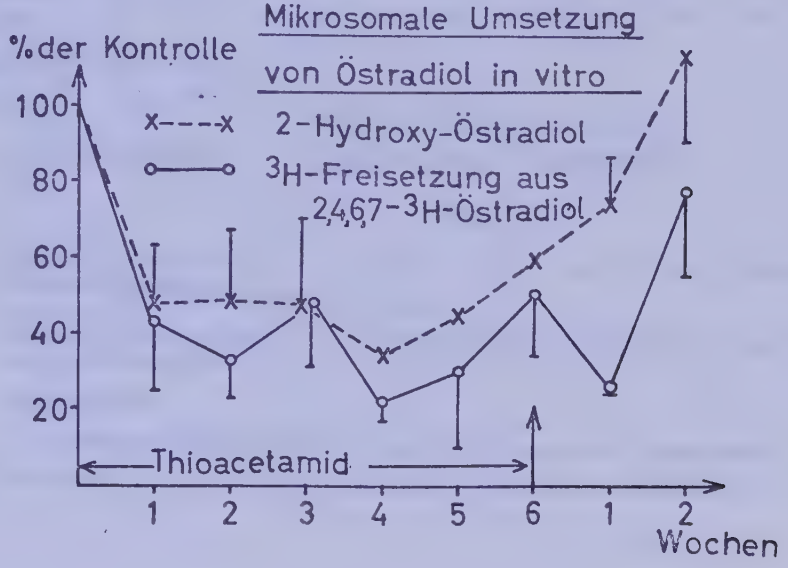


Abbildung 5: Entstehung von Östron und Östriol aus Östradiol durch Lebermikrosomen in vitro unter und nach einer 6-wöchigen Behandlung von Ratten mit Thioacetamid.

Kontrollwerte:	n	$\bar{x}$	s_x	
Entstehung von Östron (Substratkonzentration = 50 nMol/ml)	5	1,47	0,93	(nMol/mg mikros. Protein/15 min)
Entstehung von Östriol (Substratkonzentration = 50 nMol/ml)	5	1,89	0,52	(nMol/mg mikros. Progein/15 min)

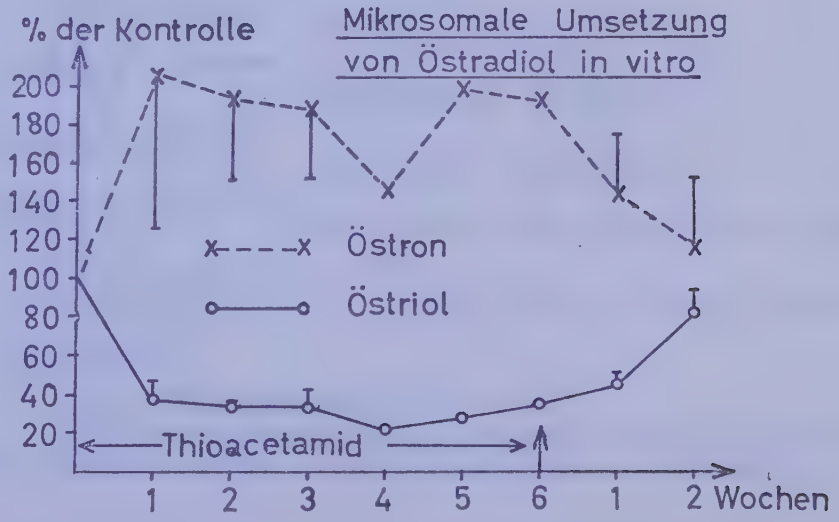
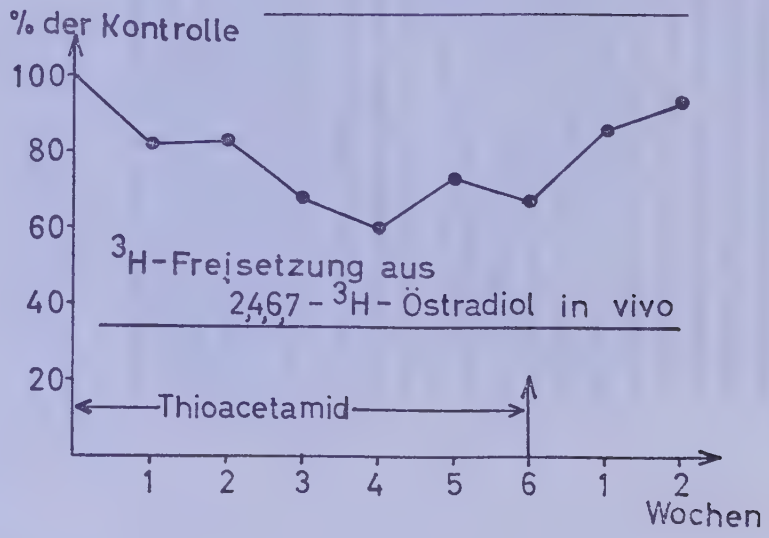


Abbildung 6: Freisetzung von ^{3}H aus 2,4,6,7-^{3}H-Östradiol als Maß der aromatischen Hydroxylierung in vivo.

Kontrollwert:

^{3}H-Freisetzung aus 2,4,6,7-^{3}H-Östradiol
(Substratkonzentration = 100 nMol/ml)

n	$\bar{x}$	s_x	
6	2540	1210	pg At H/mg Prot/min



Aus den Abb. 4 und 5 geht hervor, daß sich der zeitliche Ablauf dieser Veränderungen im wesentlichen parallel zu den Veränderungen am Cytochrom P-450 vollzieht: 2-Hydroxyöstradiol wurde durch Lebermikrosomen der Thioacetamid-behandelten Tiere in sehr vermindertem Maße gebildet; ebenso ist die Freisetzung von ^{3}H aus 2,4,6,7-^{3}H-Östradiol vermindert. Hierzu ist anzumerken, daß mit der Labilisierung des Tritiums aus 2,4,6,7-^{3}H-Östradiol auch die aromatische Hydroxylierung von intermediär gebildetem Östron (zu 2-Hydroxyöstron) erfaßt wird. Die Veränderungen vollziehen sich ebenfalls bereits in der ersten Woche der Thioacetamid-Behandlung und sind nach Absetzen des Thioacetamid reversibel. Gleiches gilt für die Veränderungen der mikrosomalen Entstehung von Östron und Östriol (s. Abb. 5): Auch hier sind die Thioacetamid-induzierten Veränderungen voll reversibel. Die beschriebenen Effekte sind nicht nur an Mikrosomen in vitro zu demonstrieren, sondern treten auch in vivo auf. So konnten Wenzel, Blum und Kraas (1968) zeigen, daß es unter chronischer Behandlung von Ratten mit Thioacetamid, ähnlich wie bei der menschlichen Leberzirrhose, in vivo zu einer vermehrten Bildung von Östron aus Östradiol kommt.

Abb. 6 zeigt, daß die Freisetzung von Tritium aus 2,4,6,7-^{3}H-Östradiol bei der Ratte auch in vivo durch Thioacetamid-Behandlung als Ausdruck einer verminderten Aktivität der Östrogen-2-Hydroxylase erniedrigt wird. Ähnlich wie bei den in vitro bestimmten Parametern kommt es während 2 Wochen nach Absetzen des Thioacetamid zur Erholung.

3.3. DIE WIRKUNG EINER LEBERSCHÄDIGUNG DURCH THIOACETAMID AUF DIE MIKROSOMALE AROMATISIERUNG VON TESTOSTERON BEI DER RATTE

Abb. 7 zeigt, daß in Gegenwart von NADPH ^3H aus 1ß,2ß-^3H-Testosteron durch mikrosomale Enzyme der Leber freigesetzt wird. Die Reaktion verläuft über 20 Minuten linear. Die Prüfung der Kofaktorabhängigkeit dieser Reaktion (Abb. 8) ergibt, daß der Zusatz von NADPH für die Reaktion essentiell ist. Die Sättigungskonzentration für NADPH liegt bei 1mM. Ersatz des NADPH durch NADH führt lediglich zu minimalen Umsätzen.

Tabelle 3 zeigt den Einfluß einer akuten bzw. chronischen Vorbehandlung der Ratten mit Thioacetamid auf die mikrosomale Freisetzung von Tritium aus 1ß,2ß-^3H-Testosteron. Während eine akute Dosis von 100 mg/kg noch keine signifikante Änderung hervorruft, führt eine akute Gabe von 200 mg/kg bzw. 300 mg/kg Thioacetamid zu einer starken Steigerung der ^3H-Freisetzung.

Werden Ratten chronisch mit Thioacetamid behandelt, (Gabe von 0,1 % im Trinkwasser) so sieht man zunächst in den ersten 1 - 3 Wochen der Behandlung eine Verringerung der mikrosomalen ^3H-Freisetzung aus 1ß,2ß-^3H-Testosteron, der dann nach sechswöchiger Behandlung eine Steigerung der ^3H-Freisetzung in etwa dem Ausmaße folgt wie sie auch bei akuter hoher Thioacetamidgabe feststellbar ist. Wird Thioacetamid in dieser Phase abgesetzt, so persistiert der Effekt über mindestens zwei Wochen.

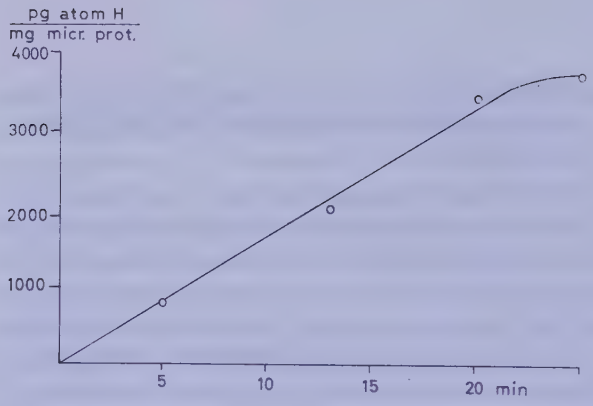


Abbildung 7: Freisetzung von Wasserstoff aus den Positionen 1ß und 2ß von Testosteron in vitro bei Inkubation von 1ß, 2ß-^{3}H-Testosteron mit Rattenlebermikrosomen (Kontrollratten) und NADPH-regenerierendem System. Zeitabhängigkeit der Reaktion.

3.4. DIE WIRKUNG WEITERER HEPATOTOXISCHER STOFFE (ÄTHANOL, CCl_4) AUF DEN ÖSTROGENSTOFFWECHSEL IM VERGLEICH ZUR THIOACETAMID-VERGIFTUNG

Äthanol-Vorbehandlung (akut oder chronisch) von Ratten bewirkt keine Veränderungen des mikrosomalen Cytochrom P-450 (Tab. 4) jedoch kommt es zu einer signifikanten Verringerung der mikrosomalen Cytochrom-c-Reduktase.

Tab. 4 zeigt, daß Äthanol-Vorbehandlung (akut oder chronisch) die mikrosomale Mestranol-Demethylierung beeinträchtigt, aber keinen signifikanten Einfluß auf die aromatische Hydroxylierung von Östradiol hat, die anhand der Freisetzung

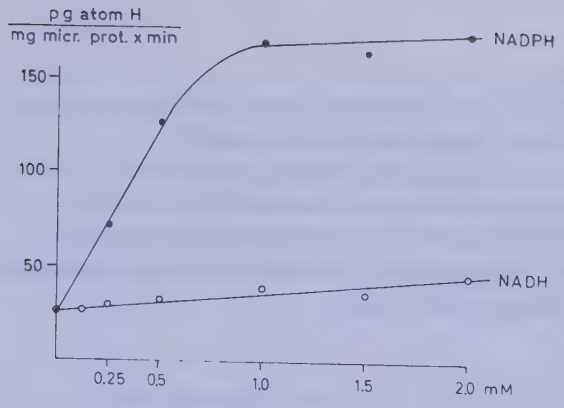


Abbildung 8: Freisetzung von Wasserstoff aus den Positionen 1ß und 2ß von Testosteron in vitro bei Inkubation von 1ß,2ß-^{3}H-Testosteron mit Rattenlebermikrosomen (Kontrollratten). Abhängigkeit vom Kofaktor, wenn statt des NADPH-regenerierenden Systems verschiedene Konzentrationen an NADH (o——o——o) bzw. NADPH (•——•——•) eingesetzt wurden.

von Tritium aus 2,4,6,7-^{3}H-Östradiol bestimmt wurde. Im Gegensatz dazu bewirken Thioacetamid und CCl_4 eine Verringerung des mikrosomalen Cytochrom P-450, jedoch keine signifikante Änderung der NADPH-Cytochrom-c-Reduktase (Tab. 5).

Die Zerstörung von Cytochrom P-450 bei CCl_4-Vergiftung (Heni und Remmer, 1970)hat eine verminderte Fähigkeit der Leber zur Mestranol-Demethylierung und zur aromatischen Östradiol-2-Hydroxylierung zur Folge (Tab. 5). Die akute Thioacetamid-Vergiftung zeigt hiervon unterschiedliche Effekte. Während es bei einer vergleichsweise niedrigen

Tabelle 3:

Aromatisierung von Testosteron durch Rattenlebermikrosomen: Einfluß einer Behandlung mit Thioacetamid.

Die Zahlen ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$) geben die Menge Wasserstoff an (pg Atom H/mg mikrosomales Protein/min), die aus den Positionen 1ß und 2ß von Testosteron bei Inkubation von 1ß, 2ß-^{3}H-Testosteron mit Mikrosomen und NADPH-regenerierendem System freigesetzt werden.

	Initialgeschwindigkeit (pg Atom H/mg mikrosomales Protein/min)	
Kontrollen (unbehandelt)	168 ± 12 (n = 6)	
Akute Behandlung mit Thioacetamid:		
100 mg/kg	156 ± 12 (n = 4)	n. s.
200 mg/kg	258 ± 67 (n = 4)	(b)
300 mg/kg	234 ± 87 (n = 4)	(a)
Chronische Behandlung mit Thioacetamid:		
1 Woche	64 ± 5 (n = 5)	(c)
3 Wochen	104 ± 17 (n = 5)	(c)
6 Wochen	275 ± 35 (n = 5)	(c)
2 Wochen Erholung nach chronischer Behandlung	269 ± 32 (n = 5)	(c)

n. s. = kein signifikanter Unterschied gegenüber Kontrollen

(a) $0{,}05 > p > 0{,}025$

(b) $0{,}01 > P > 0{,}005$

(c) $p < 0{,}001$

Tabelle 4:

Die Wirkung von akuter und chronischer Behandlung mit Äthanol auf mikrosomale Enzyme des Arznei- und Östrogenstoffwechsels der Leber.

	Vorbehandlung:			
	Kontrollen n = 8	Äthanol (akut) n = 6	Kontrollen n = 4	Äthanol (chronisch) n = 7
Cytochrom P-450 (nMol/mg Protein)	0,94 ± 0,07	1,01 ± 0,16 (n.s.)	0,96 ± 0,19	1,01 ± 0,22 (n.s.)
NADPH-Cytochrom-c-Reduktase (nMol/mg Protein/min)	116 ± 21	75 ± 32 (1)	115 ± 31	72 ± 21 (1)
Demethylierung von Mestranol (nMol/mg Protein/min)	2,64 ± 0,48	1,87 ± 0,53 (2)	1,07 ± 0,20	0,44 ± 0,11 (3)
Oxidation von 2,4,6,7-^{3}H-Östradiol (pg Atom H freigesetzt/mg Protein/min)	2040 ± 670	1690 ± 400 (n.s.)	1530 ± 670	1310 ± 370 (n.s.)

Die Daten geben $\bar{x} \pm s_x$ an.

Statistische Signifikanzgrenzen gegenüber den Kontrollen: (1) = $0{,}0125 > p > 0{,}01$
(2) = $0{,}01 > p > 0{,}005$
(3) = $0{,}0005 > p$
n.s. = nicht signifikant unterschiedlich

Tabelle 5:

Die Wirkung von Tetrachlorkohlenstoff und Thioacetamid in akuter Dosierung auf mikrosomale Enzyme des Arznei- und Östrogenstoffwechsels der Leber.

	Vorbehandlung						
	Kontrollen	CCl_4 2,5 ml/kg	CCl_4 5,0 ml/kg	Kontrollen	Thioacetamid 100 mg/kg	Thiacetamid 200 mg/kg	Thioacetamid 300 mg/kg
	n = 9	n = 6	n = 6	n = 6	n = 4	n = 4	n = 4
Cytochrom P-450 (nMol/mg Protein)	0,75±0,16	0,53±0,11 (4)	0,45±0,13 (6)	1,08±0,38	0,51±0,14 (3)	0,63±0,09 (1)	0,47±0,25 (3)
NADPH-Cytochrom-c-Reduktase (nMol/mg Prot./min)	97 ± 23	78 ± 15 (n.s.)	101 ± 19 (n.s.)	88 ± 11	83 ± 33 (n.s.)	99 ± 5 (1)	80 ± 10 (n.s.)
Demethylierung von Mestranol (nMol/mg Prot./min)	1,63±0,42	1,15±0,18 (3)	1,16±0,44 (1)	0,86±0,32	0,44±0,24 (1)	0,64±0,20 (n.s.)	1,43±0,39 (2)
Oxidation von 2,4,6,7- ^{3}H-Östradiol (pg Atom H freigesetzt/ mg Protein/min)	1270±470	850±250 (1)	600 ± 220 (5)	3100±1480	3050±1060 (n.s.)	4740±790 (1)	5120±1430 (1)

Die Daten geben $\bar{x} \pm s_x$ an.

Statistische Signifikanzgrenzen gegenüber den Kontrollen:

(1) = 0,05 >p > 0,025
(2) = 0,025>p >0,0125
(3) = 0,0125>p>0,01
(4) = 0,01 >p > 0,005
(5) = 0,005 >p>0,0025
(6) = 0,0025>p>0,0005

n.s. = nicht signifikant unterschiedlich

Dosis (100 mg/kg) zu einer Verringerung der Mestranol-Demethylierung und zu keiner signifikanten Änderung der 2-Hydroxylierung von 2,4,6,7-^{3}H-Östradiol kommt, ist nach höheren akuten Dosen (200 und 300 mg/kg) die 2-Hydroxylierung erhöht (Tab. 5). Bei chronischer Thioacetamid-Behandlung kommt es im Gegensatz hierzu zu einer deutlichen Verminderung der 2-Hydroxylierung (s. Tab. 1).

Weitere Experimente zeigen, daß die vermehrte mikrosomale Freisetzung von ^{3}H aus 2,4,6,7-^{3}H-Östradiol, die nach akuter Thioacetamid-Dosierung beobachtet wird, mit einer erhöhten Bildung von Östron aus Östradiol einhergeht (s. Tab. 6). Tetrachlorkohlenstoff hat keinen Einfluß auf die Östron-Bildung aus Östradiol. Chronische Äthanol-Behandlung bewirkt eine verringerte mikrosomale Bildung von Östron und 16α-Hydroxyöstron aus Östradiol. Im Gegensatz dazu ist die Bildung von 16α-Hydroxyöstron bei akuter Thioacetamid-Vergiftung erhöht, Die mikrosomale Östriol-Bildung zeigt keine signifikanten Veränderungen.

Die in vitro beobachteten Veränderungen des mikrosomalen Östradiolabbaus, die durch eine akute hohe Dosis (300 mg/kg) Thioacetamid hervorgerufen wurden, gaben Anlaß, auch Östron als Substrat zu untersuchen (Tab. 7). Die Ergebnisse zeigen eine vermehrte Östradiol- und 2-Hydroxyöstradiol-Bildung aus Östron, sowie eine vermehrte 16α-Hydroxylierung zu 16α-Hydroxyöstron.

Dennoch zeigt die Messung der Freisetzung von Tritium aus 2,4,6,7-^{3}H-Östron, daß insgesamt die Bildung Ring A-hydroxylierter Metabolite verringert ist. Dies spricht dafür, daß unter der angewandten akuten hoher Thioacetamid-Dosierung

Tabelle 6:

Die Wirkung von chronischer Äthanolgabe, akuter CCl_4-Gabe und akuter Thioacetamidgabe auf die mikrosomale Umwandlung von Östradiol in Östron, 16α-Hydroxyöstron und Östriol in vitro (Substratkonzentration = 100 nMol 6,7-^{3}H-Östradiol/ml).

	Vorbehandlung							
	Kontrollen	Äthanol (chron.)	Kontrollen	CCl_4 5,0ml/kg	Kontrollen	Thioacetamid 100 mg/kg	Thioacetamid 200 mg/kg	Thioacetamid 300 mg/kg
	n = 4	n = 7	§	§	n = 5	n = 4	n = 4	n = 4
Bildung von:								
Östron (nMol/mg Protein/ 15 min)	3,19±0,79	2,40±0,39 (2)	0,76	0,96	2,20±0,48	1,87±0,37 (n.s.)	3,38±0,22 (4)	9,33±4,02 (3)
16α-Hydroxyöstron (nMol/mg Protein/ 15 min)	3,44±1,11	2,61±0,19 (1)	6,35	5,23	2,67±0,85	6,16±1,75 (3)	3,77±1,31 (n.s.)	5,99±2,63 (2)
Östriol (nMol/mg Protein/ 15 min)	1,77±0,99	2,09±0,50 (n.s.)	1,90	1,62	1,81±1,08	1,66±0,56 (n.s.)	2,21±1,11 (n.s.)	1,68±0,60 (n.s.)

Die Daten geben $\bar{x} \pm s_x$ an.

Statistische Signifikanzgrenzen gegenüber den Kontrollen:

§ = Mittelwerte von Doppelbestimmungen

(1) = $0,05 > p > 0,025$
(2) = $0,025 > p > 0,0125$
(3) = $0,005 > p > 0,0025$
(4) = $0,0025 > p > 0,0005$
(n.s.) = nicht signifikant unterschiedlich

Tabelle 7:

Einfluß einer akuten Behandlung mit Thioacetamid (300 mg/kg) auf die mikrosomale Umsetzung von Östron in vitro (Substratkonzentration = 100 nMol Östron/ml).

	Kontrollen n = 6	Thioacetamid-Vorbehandlung n = 4	p (t-Test)
Bildung von:			
Östradiol (nMol/mg Protein/15 min)	8,51 ± 3,10	16,97 ± 4,45	0,005>p>0,0025
2-Hydroxyöstradiol (nMol/mg Protein/15 min)	2,31 ± 0,37	3,18 ± 0,13	0,0025>p>0,0005
16α-Hydroxyöstron (nMol/mg Protein/15 min)	2,42 ± 0,54	3,95 ± 0,39	p < 0,001
Östriol (nMol/mg Protein/15 min)	0,89 ± 0,24	1,08 ± 0,20	n.s.
Freisetzung von ^{3}H aus 2,4,6,7-^{3}H-Östron in vitro (pg Atom H/mg Protein/min)	4800 ± 1120	2360 ± 580	0,0025>p>0,0005

n.s. = nicht signifikant unterschiedlich

primär eine vermehrte Bildung von Östradiol aus Östron stattfindet; die direkte 2-Hydroxylierung von Östron zu 2-Hydroxyöstron wäre dementsprechend vermindert.

4. DISKUSSION

Die Untersuchungen, die von der Arbeitsgruppe um Fishman in den Jahren 1960 bis 1970 durchgeführt wurden (Fishman et al., 1960, 1965, 1966, 1969, 1970; Zumoff et al., 1968, 1970; Hellman et al., 1970), haben gezeigt, daß Östrogene beim Menschen in der Hauptsache durch Hydroxylierung an C-2 und C-16 abgebaut werden, wobei nach neuen Untersuchungen von Ball et al. (1975) der 2-Hydroxylierung die größere quantitative Bedeutung zukommt. Beide Abbauwege kompetieren um das zur Verfügung stehende Östrogen-Substrat (Östradiol bzw. Östron). So ist bei Hyperthyreose die Ausscheidung von 2-Hydroxyöstron erhöht und die von Östriol erniedrigt (Fishman et al., 1965), während andererseits bei Leberzirrhose die des 16α-Hydroxyöstron stark erhöht und die von 2-Hydroxyöstron erniedrigt gefunden wurde; nur leicht erhöht ist die Ausscheidung von Östriol (Zumoff et al., 1968). Hieraus schlossen Zumoff et al. (1968), daß die Veränderungen des Östrogenstoffwechsels bei der Leberzirrhose in erster Linie durch eine verminderte 2-Hydroxylierung bewirkt würden. Außerdem bestehe eine Verminderung des Umsatzes von 16α-Hydroxyöstron in Östriol.

In dieses Bild muß der Befund eingefügt werden (Fishman et al., 1966), daß das eigentliche Substrat der 16α-Hydroxylierung nicht Östradiol, sondern Östron ist. Östron entsteht aus Östradiol durch 17ß-Hydroxysteroiddehydrogenasen, die in der Leberzelle sowohl im Cytoplasma als auch im endoplasmatischen Retikulum lokalisiert sind (vergl. Formelschema Abb. 1).

Bei der Suche nach einem tierexperimentellen Modell, das die Veränderungen des Östrogenabbaus bei der menschlichen

Leberzirrhose imitiert, erschien der Befund von Wenzel et al. (1968) als sehr wesentlich, daß sowohl bei chronischer Schädigung der menschlichen Leber, als auch bei der Thioacetamid-vergifteten Ratte in vivo eine Steigerung des Umsatzes von Östradiol in Östron auftritt.

Die hier durchgeführten Untersuchungen des mikrosomalen Östradiol-Abbaus zeigen, daß bei der chronisch Thioacetamid-vergifteten Ratte einerseits die 2-Hydroxylierung von Östradiol auf ca. die Hälfte verringert ist und daß andererseits vermehrt Östron und 16α-Hydroxyöstron gefunden werden (Tab. 1 und 2). Unter Zugrundelegung des Konzeptes der Kompetition zwischen 2- und 16α-Hydroxylierung von Fishman et al. (1965) kann dies dahingehend interpretiert werden, daß ein verringerter Abbau des Östradiol durch die 2- Hydroxylase zu einem vermehrten Abbau über den alternativen Stoffwechselweg führt, zunächst also zur verstärkten Umwandlung in Östron und nachfolgend zur verstärkten 16α-Hydroxylierung.

Die leichte Verringerung der Entstehung von Östriol (Tab. 2) durch die Lebermikrosomen der Thioacetamid-vergifteten Ratte findet ihre Entsprechung in dem Befund von Zumoff et al. (1968), daß bei der menschlichen Leberzirrhose der Umsatz von 16α-Hydroxyöstron in Östriol ebenfalls verringert ist.

Die Ursache der Verringerung der 2-Hydroxylierung von Östradiol bei der Thioacetamid-vergifteten Ratte besteht wahrscheinlich in der sehr starken Reduktion des Cytochrom P-450 (Tab. 1), die auch zur Verminderung des oxidativen Abbaus von Aminopyrin und Anilin führt (Tab. 1). Es bestehen

Indizien dafür, daß die Östrogen-2-Hydroxylase ein P-450-Enzym ist (Bolt et al., 1973; Kassel und Bolt, 1976). Auch bei der menschlichen Leberzirrhose ist der Gehalt an Cytochrom P-450 erniedrigt (Schoene et al., 1972).

Die vorliegenden Daten zeigen, daß die Veränderungen des mikrosomalen Östradiolabbaus (Tab. 1 und 2) nicht nur im enzymatischen Versuch mit Lebermikrosomen in vitro, sondern auch in vivo auftreten (Abb. 2, 6). Eine deutliche Verringerung der aromatischen Östrogenhydroxylierung ist durch Thioacetamid sowohl in vivo als auch mit Lebermikrosomen entsprechend vorbehandelter Tiere in vitro feststellbar (Abb. 4). Der Zeitverlauf der Veränderungen des Östrogenstoffwechsels durch Thioacetamid entspricht dem Zeitverlauf auch anderer biochemischer Veränderungen, die Thioacetamid an der Rattenleber bewirkt (Abb. 3). Reversible Veränderungen von Enzymaktivitäten wurden unter und nach Thioacetamid bei den hepatozellulären Enzymen Glucose-6-Phosphatase, Tryptophan-Pyrrholase (Shetty et al. 1971), Phenylalanin-Pyruvat-Transaminase, Tyrosin-α-Ketoglutarat-Transaminase, Phenylalanin-Hydroxylase und p-Hydroxyphenyl-Pyruvat-Hydroxylase (Zinkham, 1975; Kunz, pers. Mitt.) beobachtet. Es ist bekannt (Rouiller, 1964), daß es unter der Behandlung von Ratten mit Thioacetamid zu einer Leberfibrose kommt, die dem histologischen Bild der menschlichen Leberzirrhose sehr ähnelt. Wegen der sehr starken Regenerationsfähigkeit der Rattenleber ist dieses histologische Bild vollständig reversibel, was den biochemischen Befunden entspricht.

Andere tierexperientelle Modelle zur Leberschädigung zeigen nicht in gleichem Maße wie die Thioacetamidvergiftung der Ratte eine biochemische Parallelität zur menschlichen Leberzirrhose: So ruft chronische Behandlung mit Äthanol eine Verminderung der NADPH-Cytochrom-c-Reduktase hervor (Tab. 4), was bei der menschlichen Leberzirrhose nicht der Fall ist (Schoene et al., 1972). Auf der anderen Seite wird durch chronische Äthanolbehandlung eine spezifische Spezies von Cytochrom P-450 induziert, die normalerweise nicht in Erscheinung tritt (Ullrich et al., 1975). Vergiftung mit Tetrachlorkohlenstoff, die das gebräuchlichste Leberschädigungsmodell darstellt, verringert zwar die Östrogen-2-Hydroxylierung (Tab. 5), beeinträchtigt aber ebenfalls die Umsetzung von Östradiol in Östron und 16α-Hydroxyöstron (Tab. 6), was bei der Leberzirrhose und auch bei der Thioacetamidvergiftung nicht der Fall ist.

Es wurde ausgeführt, daß Lebermikrosomen von Thioacetamidvergifteten Ratten eine starke Beeinträchtigung der Fähigkeit zur aromatischen Hydroxylierung von Östrogenen zeigen, was den Verhältnissen bei der menschlichen Leberzirrhose entspricht. Die hier vorgelegten Daten zeigen darüber hinaus, daß im gleichen System eine vermehrte Aromatisierung von Testosteron stattfindet (Tab. 3). Somit sind im Falle der Thioacetamidvergiftung der Ratte zwei verschiedene Faktoren gegeben, vermehrte Bildung aus androgenen Vorläufern und verminderter Abbau von Östrogenen, die zu einer Verstärkung östrogener Wirkungen führen. In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, daß Thijssen et al. (1974) postulierten, daß auch bei der menschlichen Leberzirrhose wegen eines verringerten Abbaus

von Androgenen vermehrt Androgene in Östrogene umgewandelt würden. Die vermehrte Bildung von Östrogenen aus Androgenen soll nach diesen Autoren wesentlich zu dem bei Leberzirrhotikern bestehenden Ungleichgewicht zwischen Androgenen und Östrogenen beitragen.

Die vorgelegten Daten zeigen, daß eine Leberschädigung sich unterschiedlich auf den mikrosomalen Östrogenabbau auswirken kann (siehe Tab. 1 und 4 bis 7). Die aromatische Hydroxylierung von Östradiol und die Demethylierung von Mestranol können parallel zu einer Abnahme von Cytochrom P-450 oder NADPH-Cytochrom-c-Reduktase verringert werden (Tab. 5). Bei der akuten Vergiftung mit höheren Dosen Thioacetamid werden jedoch noch weitergehende Veränderungen des Östrogenstoffwechsels beobachtet. Es wurde bereits einleitend erwähnt (siehe hierzu Abb. 1), daß Östradiol über die 17ß-Hydroxysteroid-Dehydrogenase (17-Oxidoreduktase in Abb. 1) in Östron umgewandelt wird und umgekehrt. Durch seine höhere Lipophilie gilt von diesen beiden Östrogenen Östron als besseres Substrat für die Östrogen-2-Hydroxylase. Andererseits wird Östron durch die 16α-Hydroxylase in 16α-Hydroxyöstron umgewandelt. Die vorliegenden Befunde nach akuter hoher Thioacetamid-Gabe wären erklärbar, wenn man eine primäre Steigerung der Aktivität der 17ß-Hydroxysteroid-Dehydrogenase annimmt. Wenn man nach akuter Vorbehandlung mit 300 mg/kg Thioacetamid Östradiol als Substrat für die mikrosomalen Umsetzungen wählt, so ist die Konversion in Östron um das Vierfache gesteigert, während die Umwandlung von Östron als Substrat in Östradiol verdoppelt ist. Mit der vermehrten Entstehung von Östron aus Östradiol geht eine verstärkte Bildung der Hydroxylierungsprodukte einher: Aus den Inkubationen wird eine vermehrte

Menge an 16α-Hydroxyöstron isoliert und die Freisetzung von Tritium aus 2,4,6,7-^{3}H-Östradiol steigt an (s. Tabellen 5 und 6). Andererseits steigt bei Einsatz von Östron als Substrat die Ausbeute an 2-Hydroxyöstradiol an, während die Brutto-Freisetzung von ^{3}H aus 2,4,6,7-^{3}H-Östron (die in erster Linie durch die direkte Hydroxylierung von Östron zu 2-Hydroxyöstron bedingt ist) abnimmt.

5. SCHLUSSFOLGERUNG

Die vorgelegten Ergebnisse zeigen, daß sich eine Leberschädigung durch hepatotoxische Substanzen in sehr differenzierter Weise auf den mikrosomalen Östrogen-Stoffwechsel der Leber auswirkt. Insgesamt ist zu sagen, daß unter verschiedenen tierexperimentellen Modellen zur Simulation menschlicher Leberschädigung in biochemischer Hinsicht, auch im Hinblick auf den Östrogen-Katabolismus, die Thioacetamid-geschädigte Leber der Ratte dem Bild der menschlichen Leberzirrhose sehr nahe kommt. Der wesentliche Unterschied zum humanpathologischen Befund besteht jedoch infolge der starken Regenerationsfähigkeit in der relativ raschen Reversibilität der durch Thioacetamid induzierten Veränderungen an der Leber der Ratte.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Verschiedene Arten experimenteller Leberschädigung bei Ratten wurden auf ihre Wirkung in Bezug auf den mikrosomalen Abbau natürlicher Östrogene untersucht. Äthanol in akuter oder chronischer Dosierung hatte keinen Einfluß auf die aromatische Östradiol-Hydroxylierung, die anhand der mikrosomalen Freisetzung von Tritium aus 2,4,6,7-^{3}H-Östradiol untersucht wurde. Eine stärkere Schädigung der Leber durch CCl_4 oder Thioacetamid, die auch mit einer Verringerung des mikrosomalen Cytochrom P-450 verbunden ist, beeinträchtigt den mikrosomalen Östrogenabbau. Gabe von CCl_4 führt zu einer starken Erniedrigung der aromatischen Hydroxylierung von Östradiol. Lebermikrosomen von Thioacetamid-vergifteten Ratten zeigen eine signifikante Verringerung des Cytochrom P-450. Entsprechend sind oxidative Reaktionen des Arznei-Stoffwechsels und die Östrogen-2-Hydroxylase vermindert. Nach Thioacetamid-Behandlung von Ratten kommt es zu einer vermehrten mikrosomalen Umsetzung von Östradiol in Östron und 16α-Hydroxyöstron, wahrscheinlich als Ergebnis eines verringerten Östradiol-Umsatzes über die alternative C-2-Oxidation. Die Bildung von Östriol ist nach Thioacetamid-Behandlung verringert. Diese Veränderungen des Östrogenabbaus entsprechen denen, die auch bei der Leberzirrhose des Menschen in der Literatur beschrieben wurden. In dieses Bild fügt sich ebenfalls die Beobachtung einer vermehrten mikrosomalen Aromatisierung von Testosteron nach Thioacetamidgabe ein. Die Thioacetamid-vergiftete Ratte erscheint deshalb als ein geeignetes Modell zum Studium von Veränderungen des Östrogenstoffwechsels unter Leberschädigung.

7. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

ADLERCREUTZ, H. and R. TENHUNEN: Some aspects of the interaction between natural and synthetic sex hormones and the liver.
Amer.J.Med. 49, 630-648 (1970)

BALL, P., H.P. GELBKE and R. KNUPPEN: The excretion of 2-hydroxyestrone during the menstrual cycle.
J.clin.Endocr.Metab. 40, 406-408 (1975)

BOLT, H.M. and W.H. BOLT: Pharmacokinetics of mestranol in man in relation to its oestrogenic activity.
Europ.J.clin.Pharmacol. 7, 295-305 (1974)

BOLT, H.M., H. KAPPUS and R. KÄSBOHRER: Metabolism of 17-ethynylestradiol by human liver microsomes in vitro: Aromatic hydroxylation and irreversible protein binding of metabolites.
J.clin.Endocr.Metab. 39, 1072-1080 (1974)

BOLT, H.M., H. KAPPUS and H. REMMER: Studies on the metabolism of ethynylestradiol in vitro and in vivo: The significance of 2-hydroxylation and the formation of polar products.
Xenobiotica 3, 773-785 (1973)

BOLT, H.M., and H. KASSEL: Effect of insecticide synergists on microsomal oxidation of estradiol and ethynylestradiol.
Xenobiotica 6, 33-38 (1976)

BOLT, H.M. and H. REMMER: The accumulation of mestranol and ethynylestradiol metabolites in the organism.
Xenobiotica 2, 489-498 (1972)

BRAY, G.A.: A simple efficient liquid scintillator for counting aqueous solutions in an liquid scintillation counter.
Anal.Biochem. 1, 279-285 (1960)

DALY, J.W., D.M. JERINA and B. WITKOP: Arene oxides and the NIH-shift: The metabolism, toxicity and carcinogenicity of aromatic compounds.
Experientia 28, 1129-1149 (1972)

FISHMAN, J., H.L. BRADLOW and T.F. GALLAGHER: Oxidative metabolism of estradiol.
J.biol.Chem. 235, 3104-3107 (1960)

FISHMAN, J., S. GOLDBERG, R.S. ROSENFELD, B. ZUMOFF, L. HELLMAN and T.F. GALLAGHER: Intermediates in the transformation of oral estradiol.
J.clin.Endocr.Metab. 29, 41-46 (1969)

FISHMAN, J., H. GUZIK and L. HELLMAN: Aromatic ring hydroxylation of estradiol in man.
Biochemistry 9, 1593-1598 (1970)

FISHMAN, J., L. HELLMAN, B. ZUMOFF and T.F. GALLAGHER: Effect of thyroid on hydroxylation of estrogen in man.
J. clin. Endocr.Metab. 25, 365-368 (1965)

FISHMAN, J., L. HELLMAN, B. ZUMOFF and J. CASSOUTO: Pathway and stereochemistry of the formation of estriols in man.
Biochemistry 5, 1789-1794 (1966)

HELLMAN, L., B. ZUMOFF, J. FISHMAN and T.F. GALLAGHER: Estradiol metabolism in total extrahepatic biliary obstruction.
J.clin.Endocr.Metab. 30, 161-165 (1970)

HENI, N. und H. REMMER: Die Wirkung von Tetrachlorkohlenstoff auf endoplasmatische Enzyme der Rattenleber. Arch. Toxikol. 28, 1-11 (1971)

KAPPUS, H., H.M. BOLT and H. REMMER: Affinity of ethynylestradiol and mestranol for the uterine estrogen receptor and for the microsomal mixed function oxidase of the liver. J.steroid.Biochem. 4, 121-128 (1973)

KNUPPEN, R. und H. BREUER: Biogenese von 2-Hydroxyöstrogen-3-methyläthern in vitro. Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chem. 346, 114-122 (1966)

KUNZ, W.: persönliche Mitteilung

KUSS, E.: Mikrosomale Oxydation des Östradiols-17β: 2-Hydroxylierung und 1-bzw. 4-Thioätherbildung mit und ohne 17-Hydroxyl-Dehydrogenierung. Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chem. 352, 817-836 (1971)

LISBOA B.P. and E. DICZFALUSY: Separation and characterisation of steroid oestrogen by means of thin-layer chromatography Acta.Endocr. 40, 60-81 (1962)

LOWRY, O.H., N.J. ROSEBROUGH, A.L. FARR and R.J. RANDAL: Protein measurement with the folin phenol reagent. J.biol.Chem. 193, 265-275 (1951)

OMURA, T. and R. SATO: The carbon-monoxide binding pigment of liver. J.biol.Chem. 239, 2370-2378 (1964)

PACE, N. and E.N. RATHBUN:
J.biol.Chem. 158, 667 (1945)

REMMER, H., H. GREIM, J.B. SCHENKMAN and R.W. ESTABROOK:
Methods for the elavation of hepatic microsomal mixed function oxidase levels and cytochrome P-450.
In: ESTABROOK, R.W., M.E. PULLMAN (Herausg.), Oxidation and phosphorylation.
Methods in Enzymology 10, 703-708 (1967)

ROUILLER, CH.: The liver.
Academic Press, New York and London. (1964)

SCHENKMAN, J.B., H. REMMER and R.W. ESTABROOK: Spectral studies of drug interaction with hepatic microsomal cytochrome.
Molec.Pharmacol. 3 113-123 (1967)

SCHOENE, B., R.A. FLEISCHMANN, H. REMMER and H.F. v. OLDERSHAUSEN: Determination of drug metabolizing enzymes in needle biopsies of human liver.
Europ.J.clin.Pharmacol. 4, 65-73 (1972)

SHETTY, T.K., L.M. NARURKAR and M.V. NARURKAR: Cytoplasmic changes during thioacetamide induced hepatocarcinogenesis in rats.
Br.J.Cancer 25, 109-120 (1971)

THIJSSEN, J.H.H., J. LOURENS and G.H. DONKER: Biogenesis and production of oestrogens in males with cirrhosis of the liver.
Acta Endocr. Suppl. 184, 31 (1974)

ULLRICH, V., P. WEBER and P. WOLLENBERG: Tetrahydrofurane: An inhibitor for ethanol induced liver microsomal cytochrome P-450.
Biochem.Biophys.Res.Comm. 64, 808-813 (1975)

WENZEL, M., K.U. BLUM und E. KRAAS: Die Inaktivierung von Östradiol nach Leberschädigung bei Ratten und bei leberkranken Patienten.
Z.klin.Chem.klin.Biochem. 6, 265-268 (1968)

WENZEL, M., H. KLEUCKER und E. SCHULZE: Verfolgung der in vivo-Oxidation von 17-Hydroxy- zu 17-Ketosteroiden durch Messen der Tritium-Aktivität im Körperwasser.
Z.Naturforsch. 21 b, 1178-1183 (1966)

WENZEL, M., G. KÖSTER und J. HÖNICKE: Einfacher in vivo Nachweis Barbiturat-induzierter Hydroxylasen mit Hilfe von Tritium-markierten Steroiden als Indikatoren.
Z.klin.Chem.klin.Biochem. 8, 231-234 (1970)

WENZEL, M., S. WOLF und B. BOLLERT: Bindung und Oxidation von Östradiol-17β im Uterus infantiler Ratten.
Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 352,
1148 - 1156 (1971)

WILLIAMS, C.H. and H. KAMIN: Microsomal triphosphopyridine nucleotide-cytochrome c-reductase of liver.
J.biol.Chem. 237, 587-595 (1962)

ZINKHAM, D.: Veränderungen der Aktivitätsprofile von Leber und Serumenzymen bei verschiedenen experimentellen Leberschädigungsmodellen und ihre Eignung zur Beurteilung toxischer und kurativer Substanzwirkungen.
Dissertation (1975)

ZUMOFF, B., J. FISHMAN, T.F. GALLAGHER and L. HELLMAN:
Estradiol metabolism in cirrhosis.
J.clin.Invest. 47, 20-25 (1968)

LEBENSLAUF

Am 8. 11. 1944 wurde ich, Victor H. López del Pino, als Sohn des Arztes Dr. Victor López Downton und seiner Ehefrau Maria Graciela geb. del Pino in Rancagua (Chile) geboren.

Ich besuchte die Deutsche Schule in Santiago (Chile) vom Jahre 1951 an, unterbrach die dortige Ausbildung in den Jahren 1961/1962 zum Besuch der Militärschule "Escuela Militar del General Bernardo O'Higgins" in Santiago und setzte den Besuch der Deutschen Schule 1963 fort.

Im Januar 1964 bestand ich mein Abitur ("Bachiller en Humanidades con mención en Biología"). Im März desselben Jahres begann ich mit dem Medizinstudium an der "Universidad de Chile". 1969 wirkte ich als klinischer Famulant am "Projekt Rondon" in Alvorada (Brasilien) mit.

Im Dezember 1969 bekam ich den Grad eines "Licenciado en Medicina".

Am 14. April 1971 erlangte ich die Approbation als "Médico Cirujano"

In den Monaten Mai - Juni 1971 arbeitete ich als Residenzarzt im Notfalldienst des Krankenhauses San Francisco de Borja zu Santiago.

Von Juli 1971 bis April 1974 arbeitete ich als "2. Gehilfe in Pathophysiologie" an der Medizinischen Zweigfakultät der "Universidad de Chile" mit Sitz in Temuco.

Im Januar 1973 bestand ich das amerikanische "ECFMG"-Examen.

Im Jahr 1974 erlangte ich ein Stipendium des DAAD zur Forschungstätigkeit am Institut für Toxikologie der Universität Tübingen. Mit der Arbeit in Tübingen begann ich am 1. Oktober 1974.

Seit 1973 bin ich mit Laura Quinteros verheiratet.

difo-druck · 8600 bamberg
untere königstraße 30